DIA Source

CE
0344

Anti-HCV Elisa

4.0

KAPG4NAE3

DIAsource ImmunoAssays S.A. - Rue du Bosquet, 2 - B-1348 Louvain-la-Neuve - Belgium


LOT : 110711/3



0344

Anti-HCV Elisa V 4.0.



For in-vitro qualitative detection of Antibody to Hepatitis C virus (anti-HCV) in human serum or plasma

KAPG4NAE3

IN VITRO DIAGNOSTIC USE

DIAsource ImmunoAssays SA - Rue du Bosquet 2, B-1348 Louvain-la-Neuve, Belgium Tel: +32 10 84 99 11 - Fax : +32 10 84 99 90

1) INTENDED USE

Anti-HCV Elisa V 4.0 is a forth generation enzyme immunoassay diagnostic kit for in-vitro qualitative detection of Antibody to Hepatitis C virus (anti-HCV) in human serum or plasma.

2) DESIGN THEORY/ BRIEF DESCRIPTION OF THE PRODUCT

Anti-HCV Elisa V 4.0 adopts the "direct sandwich principle" as the basis for the assay to detect antibodies to Hepatitis C virus (anti-HCV). It is a forth generation enzyme immunoassay kit, which uses recombinant HCV antigens (Core, NS3 and NS5 antigens) for the detection of Antibody to Hepatitis C virus (anti-HCV) in human serum or plasma.[*1-3] These antigens, which are reactive with the predominant antibodies of HCV, constitute the solid phase antigenic absorbent. When human serum or plasma is added to the well, the HCV antigens and Anti-HCV will form complexes on the wells if Anti-HCV is present in the specimen. The wells are washed to remove the unbound materials. The diluted HCV Ag•HRPO Conjugate is added to the well and results in the formation of (HCV) • (Anti-HCV) • (HCV Ag•HRPO) complex. After washing out the unbound conjugate, TMB substrate solution is added for color development. The intensity of color development is proportional to the amount of antibodies present in the specimen. The reaction processes are summarized as follows:

A. Specimen (containing Anti-HCV):

1. Plate (HCV Antigens) + Specimen (containing Anti-HCV) → plate (HCV Antigen)•Anti-HCV
2. Wash to remove the unbound materials.
3. Plate (HCV Antigen) •Anti-HCV + HCV Ag•HRPO → Plate (HCV Antigen)•Anti-HCV•HCV Ag•HRPO complex
4. Wash to remove the unbound materials.
5. Plate (HCV Antigen) •Anti-HCV•HCV Ag•HRPO complex + TMB Solution → light blue to blue color
6. Light blue to blue color + Stop Solution → light yellow to yellow color, measured at 450nm with a selected reference wavelength within 620 to 690nm[*4]

B. Specimen (without human Anti-HCV):

1. Plate (HCV Antigens) + Specimen (without Anti-HCV) → plate (HCV Antigen)
2. Wash to remove the unbound materials.
3. Plate (HCV Antigen) + HCV Ag•HRPO → plate (HCV Antigen)------ No complex will form
4. Wash to remove the unbound materials.
5. Plate (HCV Antigen) + TMB Solution (colorless) → colorless
6. colorless + Stop Solution → colorless, measured at 450nm with a selected reference wavelength within 620 to 690nm[*4]

3) DESCRIPTION OF PROVIDED MATERIALS & PRODUCT CODE SYSTEM

- **Item 1 - 7 on the following reagent table should be refrigerated at +2 to +8°C.
  Washing Solution D (20X) and Stop Solution can be stored at +2 to +30°C.**

ITEMS	Components	Description	Qt. per 96 tests
(1)	HCV Antigens Plate	Microtiter plate coated with HCV antigens.	1 plate
(2)	Ag HRP CONC Conc. HCV Ag•HRPO Conjugate	Contained HCV Ag•Peroxidase (Horseradish) in buffer with Bovine serum. Preservatives: 0.005 % Sodium azide and 0.05 % Enzyme stabilizer.	1bottle, 1.8 ml
(3)	CONTROL H Anti-HCV Positive Control	Inactivated human plasma positive for Anti-HCV. Preservative: 0.099 % Sodium azide.	1 bottle, 2.0 ml
(4)	CONTROL L Hepatitis C Negative Control	Normal human plasma non-reactive for Antibody to HCV. Preservative: 0.099 % Sodium azide.	1 bottle, 3.0 ml

(5)	CONJ BUF Conjugate Diluent	PB-buffer with Bovine serum and Tween-20. Preservatives: 0.005 % Sodium azide and 0.05 % Enzyme stabilizer	1bottle, 24 ml
(6)	CHROM TMB CONC Chromogenic TMB concentrate	3, 3', 5, 5'-tetramethylbenzidine (TMB) in an organic base.	1 bottle, 12 ml
(7)	SUB BUF Substrate Buffer	Citric acid buffer with Urea Hydrogen Peroxidase	1 bottle, 12 ml
(8)	WASH SOLN CONC Conc. Washing Solution D (20X)	Phosphate buffer with Tween-20.	1 bottle 110 ml
(9)	STOP SOLN Stop Solution	Stop Solution	1 bottle 12 ml

● **OTHER MATERIALS REQUIRED, BUT NOT PROVIDED**

ITEMS	Components
(1)	50µl, 100µl and 200µl, 1-ml micropipettes and tips are needed.
(2)	Water-bath at 37 +/- 1° or incubator at 37 +/- 1°.
(3)	Tubes for specimen dilution.
(4)	Plate washing equipment.
(5)	ELISA Microwell Reader: Dual wavelength 450nm with 620-690nm as reference wavelength*4, bandwidth 10nm.
(6)	Purified water: distilled or deionized water.
(7)	Fully automatic EIA micro-plate analyzer is optional. User should validate the automatic EIA micro-plate analyzer in combination with the kit.
(8)	Adhesive slip

4) INSTRUCTIONS FOR USE

4.1) Warnings

4.1.1) This reagent kit is for professional use only.
4.1.2) This reagent kit is for *in vitro* diagnosis only.
4.1.3) Bring all kit reagents and samples to room temperature (+20 to +30°C) and mix carefully before use.
4.1.4) Do not use reagent past its expiration date.
4.1.5) Do not interchange reagents between different lots.
4.1.6) Do not put pipette in mouth.
4.1.7) Do not smoke or eat in areas where specimens or reagents are handled.
4.1.8) All kit components and specimens should be regarded as potential hazards to health. It should be used and discarded according to your own laboratory's safety procedures. Such safety procedures probably will include the wearing of protective gloves and avoiding the generation of aerosols.
4.1.9) Potential infectious specimens and non-acid containing spills or leakages should be wiped up thoroughly with 5% sodium hypochlorite or treated in accordance with your practice for potential bio-hazard control.
4.1.10) Prior to dispose the waste of used specimens and kit reagents as general waste; it should be treated in accordance with your treatment practice of potential bio-hazardous waste or treated as follows:
Both liquid and solid waste should be autoclaved at 121°C for at least 30 minutes.
Solid waste can also be incinerated.
Non-acidic liquid waste can be treated with sodium hypochlorite diluted to a final concentration of 1%.
Acidic liquid wastes must be neutralized before treatment with sodium hypochlorite as mentioned above and should stand for 30 minutes to obtain effective disinfection.
4.1.11) Stop Solution is an irritant to skin, eyes, respiratory tract and mucous membranes. Avoid contact of the Stop Solution with skin and mucous membranes. In case of contact, flush immediately with abundant amounts of water.
In case of inhalation, find fresh air immediately and seek medical advice in case of pain.
4.1.12) Chromogenic TMB concentrate contains organic solvent, which is flammable. Chromogenic TMB concentrate contains dimethyl sulfoxide, an irritant to skin and mucous membranes.
4.1.13) Although all human sourced material are tested free from HBsAg and Anti-HIV and inactivated at 56°C for one hour, the reagent should still be handled as potential infectious material. *5

4.2) Specimen Collection and Storage

4.2.1) Either serum or plasma can be used with this diagnostic kit. Whole blood specimens should be separated as soon as possible in order to avoid hemolysis. Any particulates (e.g. fibrin clots, erythrocytes) contained in the specimen should be removed prior to use.
4.2.2) Specimens must be stored at +2 to +8°C and avoided heat-inactivation to minimize deterioration. For long-term storage, they should be frozen below -20°C. Storage in self-defrosting freezer is not recommended.
4.2.3) Frozen specimens must be thoroughly thawed and mixed homogenously before test.
4.2.4) Avoid multiple freeze-thaw procedures.
4.2.5) Incompletely coagulated sera and microbial-contaminated specimens should not be used.

4.3) Reagents Storage

4.3.1) The kit must be stored at +2 to +8°C. Do not freeze.
4.3.2) Strips of the plate should be used within one month once the original aluminum foil bag is opened. The unused strips should be kept in the aluminum foil bag and taped the opening tightly.
4.3.3) Return reagents to +2 to +8°C immediately after use.
4.3.4) Washing Solution D (20X) Concentrate can be stored at room temperature to avoid crystallization, because the kits are stored and shipped at +2 to +8°C. If the crystal has been precipitated before use, warm up the solution in 37°C water bath till crystal dissolved.

4.4) Plate Washing Procedure

4.4.1) Preparation of washing solution:
Dilute Washing Solution D (20X) Concentrate with distilled or de-ionized water to 1:20 dilution. Do not use tap water.
4.4.2) Plate washing:
(a) For plate washer with overflow aspirating function: 6 cycles with at least 0.5ml washing buffer per well per cycle.
Or
(b) For plate washer without overflow aspirating function: 8 cycles with at least 0.35ml washing buffer per well per cycle.
4.4.3) Blot dry by inverting the plate and tapping firmly onto absorbent paper. Too much residual wash buffer will cause false results.
WARNING
Improper washing will cause false results.

4.5) Test Procedure

4.5.1) Bring all reagents and specimens to room temperature (+20 to 30°C) before assay. Adjust water bath or incubator to 37 ± 1 °C.
4.5.2) Preparation **of Diluted Conjugate**
1. Use only clean container to avoid contamination.
2. Prepare diluted conjugate by making 1:20 dilution of Conc. HCV Ag•HRPO conjugate with conjugate diluent, or following Conjugate Preparation Chart below. Swirl gently to mix thoroughly and avoid foaming.
3. Excess diluted conjugate solution should be discarded after use.

Conjugate Preparation Chart:

Number of Wells used	Volume of Conjugate Diluent needed (ml)	Volume of Conc. HCV Ag• HRPO conjugate needed (µl)
8	1	50
16	2	100
24	3	150
32	4	200
40	5	250
48	6	300
56	7	350
64	8	400
72 - 80	9	450
81 - 96	10	500

4.5.3) Reserve one well for blank.
Do not add any specimen or specimen diluent into the well for blank.
4.5.4) Prepare the needed number of wells, including 1 well for Blank, 3 wells for Negative Control, 2 wells for Positive Control, and 1 well for each Specimen.
4.5.5) Sample input:
4.5.5.1) Add 100µl of Positive Control, Negative Control and specimen to each appropriate well of HCV Antigens Plate.
4.5.5.2) Mix well by tapping the plate gently.
NOTE: Use a new pipette tip after each sampling to avoid cross-contamination.

4.5.6) Seal the Plate with an Adhesive Slip.
4.5.7) Incubate the plate in a 37 ± 1 °C water bath or circulative incubator for 60 minutes.
NOTE: Do not stack plates.
4.5.8) At the end of the incubation period, remove carefully the adhesive slip and discard.
4.5.9) Wash the plate according to section §4.4. Plate Washing Procedure.
4.5.10) Add 100µl of the Diluted Conjugate in each well, except the blank.
4.5.11) Seal the plate with an Adhesive Slip.
4.5.12) Incubate the Plate in a 37 ± 1 °C water bath or circulative incubator for 30 minutes.
4.5.13) Repeat step 4.5.8) and 4.5.9)
4.5.14) Select one of the following methods for color development:

A. Mix equal volumes of Chromogenic TMB concentrate and Substrate Buffer in a clean container immediately prior to use. Add 100µl of the mixture solution to each well including the blank.
B. Add 50µl of Chromogenic TMB concentrate first, and then add 50µl of Substrate Buffer into each well including the blank. Carefully mix well.

NOTE: Chromogenic TMB concentrate should be colorless to light blue; otherwise, it should be discarded. The mixture of Chromogenic TMB concentrate and Substrate Buffer should be used within 30 minutes after mix. The mixture should be avoided from intense light.

4.5.15) Seal the plate with an Adhesive Slip and incubate at 37 ± 1°C for 15 minutes.
4.5.16) Stop the reaction by adding 100µl of Stop Solution to each well including the blank.
4.5.17) Determine the absorbance of Controls and test specimens within 15 minutes, measured at 450nm with a selected reference wavelength within 620 to 690nm[*4].
Use the blank well to blank the spectrophotometer.

NOTE: The color of the blank should be colorless to light yellowish; otherwise, the test results are invalid. Substrate blank : absorbance value must be less than 0.100 OD.

4.6) Calculation of Tested Data

4.6.1) Calculation of the NCx (Mean Absorbance of Negative Control).
Example:

Sample No.	Absorbance
1	0.045
2	0.060
3	0.051

NCx = (0.045+0.060+0.051) / 3 = 0.052

NCx must be ≤ 0.200, otherwise the test is invalid.

4.6.2) Calculation of PCx (Mean Absorbance of Positive Control)
Example:

Sample No.	Absorbance
1	1.510
2	1.826

PCx = (1.510 + 1.826) /2 = 1.668

PCx must be ≥ 0.600, otherwise the test is invalid.

4.6.3) Calculation of **P-N Value**
P-N = PCx **-** NCx
Example:
P - N = 1.668 – 0.051 = 1.617
P - N Value must be ≥ 0.400, otherwise the test is invalid.

4.6.4) Calculation of the **Cutoff Value**
Cutoff Value = NCx + 0.100
Example:
Cutoff Value = 0.053+0.100 = 0.153

4.6.5) Calculate the cut-off index of the specimens
Cutoff Index
=Sample OD Value / Cutoff Value
Example:
Sample Value is 0.596
Cutoff Index = 0.596/0.153 = 3.895
4.6.6) Gray Zone: Cut-off index = 1.000 ～ 1.500

4.7) Quality Control of the Test Run

4.7.1) **NCx must be ≤ 0.200, otherwise the test is invalid.**

4.7.2) **PCx must be** ≥ **0.600, otherwise the test is invalid.**

4.7.3) **P-N Value must be ≥ 0.400, otherwise the test is invalid.**
NOTE: Negative Control: absorbance value must be less than or equal to 0.200 after subtracting the blank.

4.8) Result Interpretation

4.8.1) Specimens with **CUTOFF INDEX ＜ 1.000** are considered **NON-REACTIVE** by the criteria of DIAsource's Anti-HCV Elisa V 4.0.
4.8.2) Specimens with **CUTOFF INDEX ≥ 1.000** are considered as initially **REACTIVE**. They should be **RETESTED** in duplicate.
If both **CUTOFF INDEXES** of the duplicate are **GREATER** than 1.500, the specimen is considered to be repeatedly **REACTIVE** for Anti-HCV by the criteria of DIAsource ImmunoAssays SA's Anti-HCV Elisa V 4.0.
Specimens repeatedly reactive in the Anti-HCV Elisa V 4.0 should be further tested by additional, more specific tests.
4.8.3) Initially reactive specimens, of which both **CUTOFF INDEXES** of the duplicate retest are **LESS** than **1.000**, will be considered **NON-REACTIVE** for Anti-HCV.
4.8.4) If one of the two **CUTOFF INDEXES** of the duplicate is **GREATER** than **1.000** but **LESS** than **1.500**, the specimen may be interpreted as **QUESTIONABLE** and this individual should be monitored in follow up samples, or additional more specific tests should be used.
4.8.5) If one of the **CUTOFF INDEX** of the duplicate is **GREATER** than **1.500** and the other one is **LESS** than **1.000**, this indicates unusual experimental **error**. The test should be repeated again.

4.9) Troubleshooting

If the result cannot be reproduced, please do your own preliminary troubleshooting by checking the possibilities listed below:
4.9.1) Improper washing procedure.
4.9.2) Contaminated with positive specimen.
4.9.3) Add wrong volume of sample, conjugate or substrates.
4.9.4) The well rim is contaminated with conjugate.
4.9.5) Improper specimen such as hemolyzed serum or plasma, specimen containing precipitate and specimen not being mixed well before use.
4.9.6) Wrong incubation time or temperature.
4.9.7) Obstructed or partial obstructed washer aspirate/dispense head and needles.
4.9.8) Insufficient aspiration.

4.10) Limitations and Interferences

4.10.1) This reagent kit is to be used for un-pooled human serum or plasma only.
4.10.2) The reagent kit has not been validated for use with cadaveric samples.
4.10.3) Specimens with very low level of Anti-HCV may not consistently repeat positive. In this case, it is recommended to test follow-up samples.
4.10.4) Anti-HCV negative result does not preclude the possibility of infection with HCV.
4.10.5) Non-repeatable false positive results may occur due to non-specific binding of the sample and conjugate to the wall of the well(s).
4.10.6) Potential Interfering Substances: there is no significant influence on Anti-HCV Elisa V 4.0.

4.11) Storage Conditions and Stability

Kit/components	Storage condition	State	Stability
Anti-HCV Elisa V 4.0 KIT	+2 to +8°C	Original	18 months
		Once open	1 month
Anti-HCV Positive Control	+2 to +8°C	Original	18 months
		Once open	1 month
Hepatis C Negative Control	+2 to +8°C	Original	18 months
		Once open	1 month
HCV Antigens Plate	+2 to +8°C	Original	18 months
		Once open	1 month
Conc. HCV Antigen•HRPO Conjugate Solution	+2 to +8°C	Original	18 months
		Once open	1 month
Conc. HCV Antigen•HRPO Conjugate Solution	Room temp.	Diluted	6 hours
	+2 to +8°C	Diluted	2 days
Conjugate Diluent	+2 to +8°C	Original	18 months
		Once open	1 month
Washing Solution D Concentrate (20X)	Room temp.	Original	24 months

		Once open	1 month
20X Diluted Washing Solution	Room temp.	Diluted	2 days
	+2 to +8°C	Diluted	1 week
Chromogenic TMB concentrate	+2 to +8°C	Original	24 months
		Once open	1 month
Substrate Buffer	+2 to +8°C	Original	24 months
		Once open	1 month
TMB Substrate Solution Mixture	Room temp.	Mixture	6 hours
Stop Solution	Room temp.	Original	24 months
		Once open	1 month

4.12) Performance Characteristics

4.12.1) Analytical Specificity

Potential Interfering Substances: There is no significant influence on Anti-HCV Elisa V 4.0.

Potential Interfering Substances	n tests	n reactive	n non-reactive
Serum with interfering substances in fixed ratios (Triglycerides, hemoglobin, bilirubin, monoclonal IgG and IgM, and rheumatoid factor)	50 tests	0	50
Inhibition panels (EDTA, hemoglobin, triglyceride, bilirubin, and heparin)	14 negative samples 14 positive samples	0 14	14 0
Anticoagulant Panels (Serum, EDTA plasma, heparinized plasma, and citrated plasma)	25 negative samples 25 positive samples	0 25	25 0
Total	128 tested samples	39	89

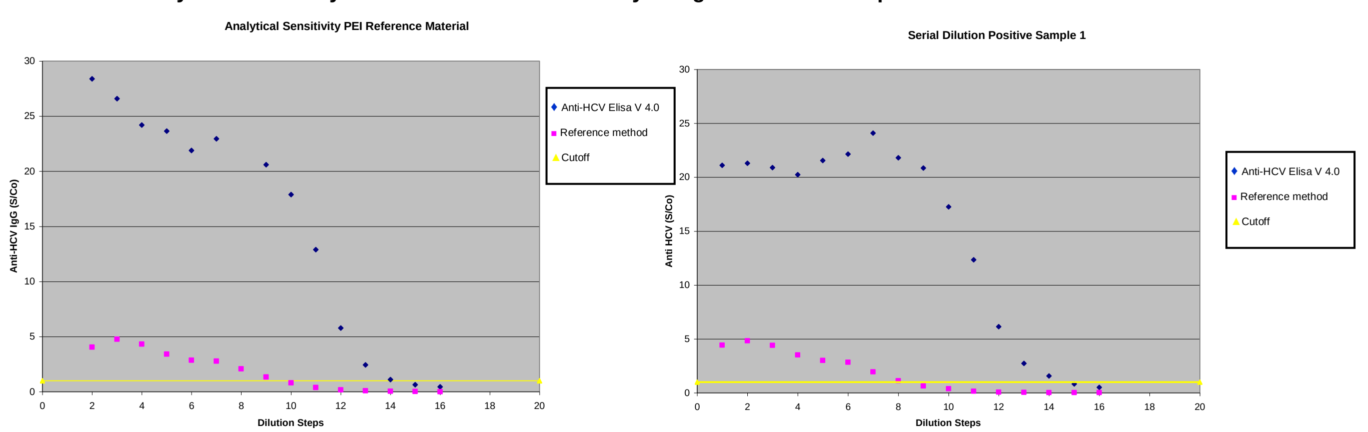
4.12.2) Clinical Specificity

Clinical specificity = 5356/5369 = 99.8 %

Potential Interfering Substances	n tests	n reactive	n non-reactive	Specificity
Blood donors	5169	12	5157	99.77 %
Clinical / hospital specimens	200	1	199	99.5 %
Potentially cross-reacting serum / plasma specimens	100	0	100	100 %
Total	5369	13	5356	99.8 %

4.12.3) Analytical Sensitivity

The analytical sensitivity of Anti-HCV Elisa V 4.0 assay is higher than the comparison test.



Serial Dilution Positive Sample 2

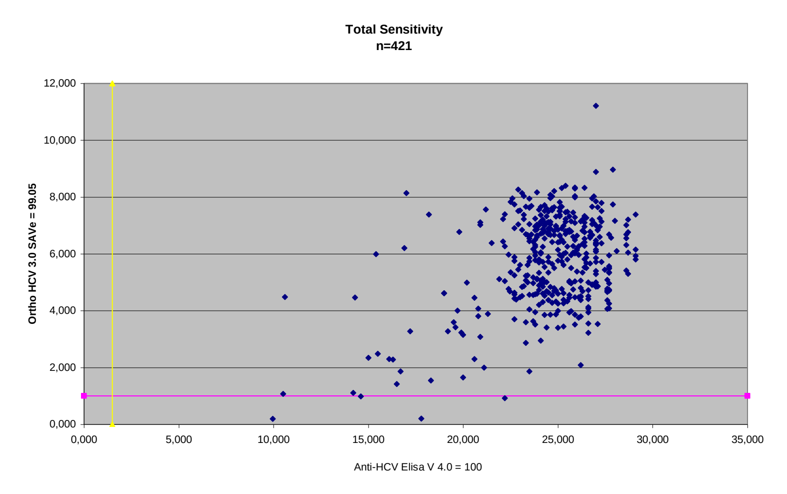
Serial Dilution of the Positive Control

PeliCheck Anti-HCV Reference Panel

4.12.4) Clinical Sensitivity

1. HCV infected individuals :

   The diagnostic sensitivity of the DIAsource ImmunoAssays SA Anti-HCV Elisa V 4.0 was determined to be 100 %.
   421 of 421 positive samples including 20 samples per genotype for genotypes 1a – 4a and 5 samples for genotype 6 were tested and confirmed reactive for HCV antibodies.



2. Commercial seroconversion panels :

   Anti-HCV Elisa V 4.0 assay showed a higher seroconversion sensitivity in comparison with the chosen reference method which is CE-marked anti-HCV ELISA.
   The total number of tested samples from the 22 seroconversion panels amounted to 198. Sixty three (63) of these samples were tested reactive with Anti-HCV Elisa V 4.0 assay, whereas only 44 of these samples were found to be reactive with the reference method.

4.12.5) Precision

1. Intra-assay Reproducibility

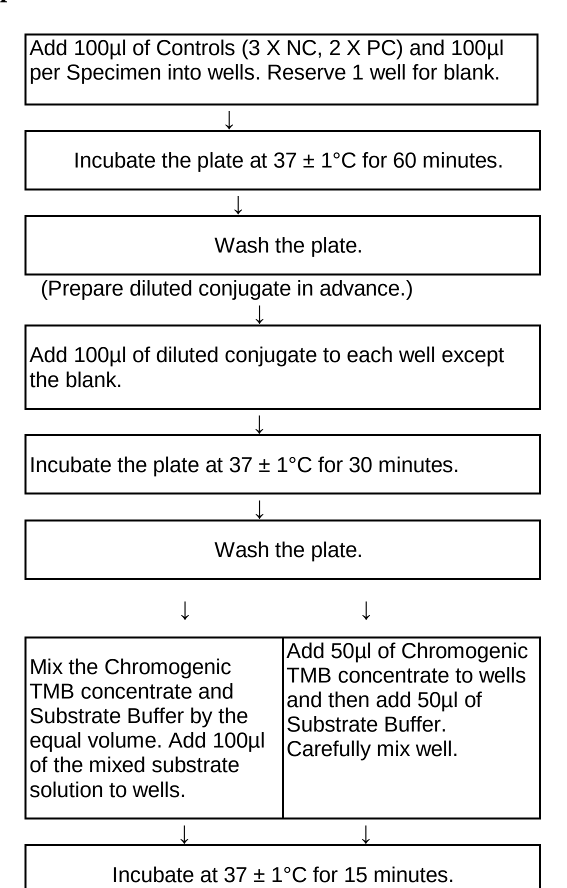
CUTOFF INDEX	Positive Serum 1		Positive Serum 2		Positive Control	
	Mean	CV (%)	Mean	CV (%)	Mean	CV (%)
Day 1	4.49	7.22	9.01	5.94	21.79	4.91
Day 2	4.16	13.06	8.54	9.41	21.44	4.23
Day 3	5.07	5.24	10,64	9,27	21,70	3,08
Mean	**4.57**	**8.51**	**9.40**	**8.21**	**21.64**	**4.07**

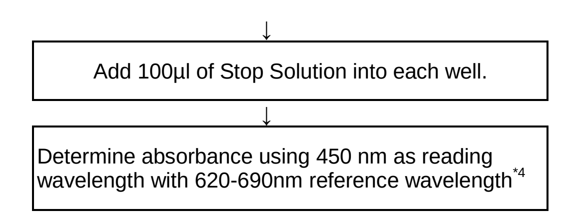
2. Total Imprecision

Lot C68332PT		CUTOFF INDEX			
Run-No	Run Date	NC	PS1	PS2	PC
1	15/7/08	0.31	5.03	10.70	22.50
2	18/7/08	0.30	4.52	7.83	23.56
3	18/7/08	0.30	4.83	9.58	21.16
4	21/7/08	0.29	5.72	10.40	21.38
5	22/7/08	0.33	4.91	8.82	20.72
6	22/7/08	0.33	4.53	10.10	17.25
7	23/7/08	0.27	3.79	6.39	16.86
8	23/7/08	0.34	4.21	8.08	18.42
9	24/7/08	0.29	5.03	7.96	20.59
10	24/7/08	0.35	4.59	8.48	20.59
MEAN		**0.31**	**4.73**	**8.83**	**20.30**
SD		**0.03**	**0.52**	**1.36**	**2.17**
CV		**8.34**	**11.05**	**15.34**	**10.69**

Lot C68333PT		CUTOFF INDEX			
Run-No	Run Date	NC	PS1	PS2	PC
1	19/8/08	0,33	5,63	10,05	20,08
2	19/8/08	0,25	4,96	10,50	18,10
3	20/8/08	0,29	5,62	10,50	21,48
4	21/8/08	0,34	4,05	9,49	20,05
5	21/8/08	0,33	5,31	10,20	19,36
6	22/8/08	0,31	5,34	8,97	19,08
7	22/8/08	0,31	5,39	9,16	19,72
8	25/8/08	0,25	4,31	8,64	18,79
9	25/8/08	0,30	5,74	10,60	21,10
10	26/8/08	0,27	6,03	11,30	20,83
MEAN		**0,30**	**5,15**	**9,94**	**19,86**
SD		**0,03**	**0,63**	**0,85**	**1,07**
CV		**10,82**	**12,22**	**8,51**	**5,39**

4.13) Flow chart of the test procedure





5) BIBLIOGRAPHY

*1 Abe K, Inchauspe C, Shikate T, and Prince AM. (1992) Three different patterns of hepatitis C virus infection on chimpanzees. Hepatology, 15:690.

*2 Claets H, Volckaerts A, De Beenhouwer H, Vermylen C. (1992) Association of hepatitis C virus carrier state with the occurrence of hepatitis C virus core antibodies. J. Med. Virol. 36:259-264.

*3 Beach MJ, et al. (1992) Temporal relationship of hepatitis C virus RNA and antibody responses following experimental infection of chimpanzee. J Med. Virol. 36:226-237.

*4 The reference wavelength of spectrometer could be 620nm to 690nm. However, user should validate the spectrometer in combination with this kit before use.

*5 Incomplete inactivation of hepatitis B virus after heat treatment at 60°C for 10 hours, J. Infect. Dis. 138:242-244.

*6 The supplier is: VQC-AcroMetrix: Jan Steenstraat 1,NL-1816 CT Alkmaar, The Netherlands. Type 7 is available in lyophilised or liquid format. The catalogue numbers are S2233 (lyophilised format) and S2058 (liquid format).

*7 National Inst. For Biological Standards & Control (NIBSC), Blabche Lane South Mimms Potters Bar Herts EN6 3QG, UK; Anti-HCV British Working Standard, Product Code: 02/238-004.

Revision date : 2011-07-11



0344

Anti-HCV Elisa V 4.0.



Pour la détection qualitative in vitro d'anticorps dirigés contre le virus de l'hépatite C (anti-HCV) dans le sérum ou le plasma humain

KAPG4NAE3

DIAGNOSTIC IN VITRO

DIAsource ImmunoAssays SA - Rue du Bosquet 2, B-1348 Louvain-la-Neuve, Belgique Tél : +32 10 84 99 11 - Fax : +32 10 84 99 90

1) BUT DU DOSAGE

L'**anti-HCV Elisa V 4.0** est un kit de diagnostic par essai immuno-enzymatique de quatrième génération pour la détection qualitative in vitro d'anticorps dirigés contre le virus de l'hépatite C (anti-HCV) dans le sérum ou le plasma humain.

2) THÉORIE DE FONCTIONNEMENT/BRÈVE DESCRIPTION DU PRODUIT

L'anti-HCV Elisa V 4.0 applique le « principe du sandwich direct » comme base de l'essai pour détecter les anticorps dirigés contre le virus de l'hépatite C (anti-HCV). Il s'agit d'un kit d'essai immuno-enzymatique de quatrième génération qui utilise des antigènes HCV recombinants (antigènes capsidiques, NS3 et NS5) pour détecter des anticorps dirigés contre le virus de l'hépatite C (anti-HCV) dans le sérum ou le plasma humain.[*1-3] Ces antigènes, réactifs pour les anticorps prédominants dirigés contre le HCV, constituent l'absorbant antigénique de la phase solide. Lorsque le sérum ou le plasma humain est ajouté aux puits, les antigènes HCV et l'anti-HCV forment des complexes sur les puits si des anti-HCV sont présents dans l'échantillon. Les puits sont rincés pour retirer le matériel non lié. Le conjugué HCV Ag•HRPO dilué est ajouté aux puits et entraîne la formation du complexe (HCV) • (Anti-HCV) • (HCV Ag•HRPO). Après lavage du conjugué non lié, une solution de substrat TMB est ajoutée pour coloration. L'intensité de la coloration est proportionnelle à la quantité d'anticorps présents dans l'échantillon. Les processus de réaction sont décrits ci-dessous :

A. Échantillon (contenant des Anti-HCV) :

1. Plaque (antigènes HCV) + échantillon (contenant des Anti-HCV) → plaque (antigène HCV)•Anti-HCV
2. Laver pour retirer le matériel non lié.
3. Plaque (antigène HCV)•Anti-HCV + HCV Ag•HRPO → Plaque complexe (antigènes HCV)•Anti-HCV•HCV Ag•HRPO
4. Laver pour retirer le matériel non lié.
5. Plaque complexe (antigènes HCV) •Anti-HCV•HCV Ag•HRPO + solution TMB → couleur bleu clair à bleu
6. Couleur bleu clair à bleu + solution d'arrêt → couleur jaune clair à jaune, mesurée à 450 nm avec une longueur d'onde de référence sélectionnée entre 620 et 690 nm[*4]

B. Échantillon (sans anti-HCV humain) :

1. Plaque (antigènes HCV) + échantillon (sans Anti-HCV) → plaque (antigène HCV)
2. Laver pour retirer le matériel non lié.
3. Plaque (antigènes HCV) + HCV Ag•HRPO → plaque (antigènes HCV) ------ Aucun complexe ne se forme
4. Laver pour retirer le matériel non lié.
5. Plaque (antigènes HCV) + solution TMB (incolore) → incolore
6. Incolore + solution d'arrêt → incolore, mesuré à 450 nm avec une longueur d'onde de référence sélectionnée entre 620 et 690 nm[*4]

3) DESCRIPTION DU MATÉRIEL FOURNI ET DU SYSTÈME DE CODE DU PRODUIT

- **Les articles 1 - 7 du tableau de réactifs suivant doivent être réfrigérés entre +2 et +8 °C. La solution de lavage D (20X) et la solution d'arrêt peuvent être conservées entre +2 et +30 °C.**

ARTICLES	Composants	Description	Qté par 96 tests
(1)	Plaque antigènes HCV	Plaque de microtitration tapissée d'antigènes HCV.	1 plaque
(2)	Ag HRP CONC Conjugué HCV Ag•HRPO concentré	Contient de l'HCV Ag•Peroxydase (raifort) dans un tampon avec du sérum bovin. Conservateurs : 0,005 % d'azoture de sodium et 0,05 % de stabilisateur d'enzyme.	1 flacon, 1,8 ml
(3)	CONTROL H Contrôle Anti-HCV positif	Plasma humain inactivé positif pour l'anti-HCV. Conservateur : 0,099 % d'azoture de sodium.	1 flacon, 2,0 ml
(4)	CONTROL L Contrôle Hépatite C négatif	Plasma humain normal non réactif pour les anticorps dirigés contre l'HCV. Conservateurs : 0,099 % d'azoture de sodium.	1 flacon, 3,0 ml

(5)	CONJ BUF Diluant du conjugué	Tampon PB avec du sérum bovin et du Tween-20. Conservateurs : 0,005 % d'azoture de sodium et 0,05 % de stabilisateur d'enzyme.	1 flacon, 24 ml
(6)	CHROM TMB CONC Chromogéne TMB concentré	3, 3', 5, 5'-tétraméthylbenzidine (TMB) dans une base organique.	1 flacon, 12 ml
(7)	SUB BUF Tampon du substrat	Tampon acide citrique avec peroxydase d'hydrogène urée	1 flacon, 12 ml
(8)	RINC SOLN CONC Solution de lavage D conc. (20X)	Tampon phosphate avec Tween-20.	1 flacon 110 ml
(9)	STOP SOLN Solution d'arrêt	Solution d'arrêt	1 flacon 12 ml

● **MATÉRIEL REQUIS MAIS NON FOURNI**

ARTICLES	Composants
(1)	Micropipettes de 50 µl, 100 µl, 200 µl et 1 ml et des embouts sont nécessaires.
(2)	Bain-marie à 37 +/- 1° ou incubateur à 37 +/- 1°.
(3)	Tubes pour la dilution de l'échantillon.
(4)	Matériel de lavage de la plaque.
(5)	Lecteur de micropuits ELISA : Longueur d'onde double à 450 nm avec longueur d'onde de référence de 620 à 690 nm*4, bande passante 10 nm.
(6)	Eau purifiée : eau distillée ou désionisée.
(7)	Un analyseur de microplaque pour EIA totalement automatique est facultatif. L'utilisateur doit valider l'analyseur de microplaque pour EIA automatique par rapport au kit.
(8)	Bande adhésive

4) MODE D'EMPLOI

4.1) Avertissements

4.1.1) Ce kit de réactifs est uniquement à usage professionnel.
4.1.2) Ce kit de réactifs est uniquement destiné à un diagnostic *in vitro*.
4.1.3) Placer l'ensemble des réactifs du kit et des échantillons à température ambiante (+20 à +30 °C) et mélanger soigneusement avant utilisation.
4.1.4) Ne pas utiliser les réactifs après la date d'expiration.
4.1.5) Ne pas échanger les réactifs entre différents lots.
4.1.6) Ne pas porter la pipette à la bouche.
4.1.7) Ne pas fumer ou manger dans les zones où des échantillons ou des réactifs sont manipulés.
4.1.8) Tous les composants du kit et les échantillons doivent être considérés comme potentiellement dangereux pour la santé. Ils doivent être utilisés et éliminés conformément aux procédures de sécurité de votre laboratoire. Ces procédures de sécurité incluent probablement le port de gants de protection et éviter de produire des aérosols.
4.1.9) Les échantillons potentiellement infectieux et les déversements ou fuites non acides doivent être nettoyés minutieusement à l'aide d'hypochlorite de sodium à 5 % ou traités selon votre procédure de contrôle des risques biologiques potentiels.
4.1.10) Avant d'éliminer les échantillons et les kits de réactifs usagés dans les ordures ménagères, ils doivent être traités conformément à la procédure locale de traitement des déchets biologiques potentiellement dangereux ou comme suit :
Les déchets liquides et solides doivent être stérilisés par autoclave à +121 °C pendant au moins 30 minutes.
Les déchets solides peuvent également être incinérés.
Les déchets liquides non acides peuvent être traités à l'aide d'hypochlorite de sodium dilué à une concentration finale de 1 %.
Les déchets liquides acides doivent être neutralisés avant traitement à l'aide d'hypochlorite de sodium tel que mentionné ci-dessus et doivent être stérilisés pendant 30 minutes pour obtenir une désinfection effective.
4.1.11) La solution d'arrêt est un irritant pour la peau, les yeux, les voies respiratoires et les muqueuses. Éviter le contact de la solution d'arrêt avec la peau et les muqueuses. En cas de contact, laver immédiatement et abondamment à l'eau.
En cas d'inhalation, respirer immédiatement de l'air frais et consulter un médecin en cas de douleur.
4.1.12) Le chromogéne TMB concentré contient un solvant organique inflammable. Le chromogéne TMB concentré contient du sulfoxyde de diméthyle, un irritant pour la peau et les muqueuses.
4.1.13) Bien que tous les échantillons d'origine humaine soient testés exempts d'HBsAg et d'anti-HIV et ont été inactivés à +56 °C pendant une heure, le réactif doit être manipulé comme une substance potentiellement infectieuse. *5

4.2) Collecte et stockage des échantillons

4.2.1) Du sérum ou du plasma peut être utilisé avec ce kit de diagnostic. Les échantillons de sang total doivent être séparés au plus tôt pour éviter l'hémolyse. Toute particule (par ex., caillots de fibrine, érythrocytes) contenue dans l'échantillon doit être retirée avant utilisation.
4.2.2) Les échantillons doivent être stockés entre +2 et +8 °C et éviter l'inactivation par la chaleur pour minimiser la détérioration. Pour un stockage de longue durée, ils doivent être congelés en dessous de -20 °C. Un stockage en congélateur à dégivrage automatique n'est pas recommandé.
4.2.3) Les échantillons congelés doivent être entièrement décongelés et mélangés de façon homogène avant le test.
4.2.4) Éviter les procédures de congélation-décongélation multiples.
4.2.5) Les sérums partiellement coagulés et les échantillons avec une contamination bactérienne ne doivent pas être utilisés.

4.3) Stockage des réactifs

4.3.1) Le kit doit être conservé entre +2 et +8 °C. Ne pas congeler.
4.3.2) Les barrettes de la plaque doivent être utilisées dans le mois suivant l'ouverture du sachet en aluminium d'origine. Les barrettes non utilisées doivent être conservées dans le sachet en aluminium qui doit être solidement fermé.
4.3.3) Replacer les réactifs entre +2 et +8 °C immédiatement après utilisation.
4.3.4) La solution de lavage concentrée (20X) peut être conservée à température ambiante pour éviter la cristallisation, car les kits sont conservés et expédiés entre +2 et +8 °C. Si des cristaux se sont formés avant utilisation, réchauffer la solution dans un bain-marie à 37 °C jusqu'à dissolution des cristaux.

4.4) Procédure de lavage de la plaque

4.4.1) Préparation de la solution de lavage :
Diluer la solution de lavage D concentrée (20X) avec de l'eau distillée ou désionisée pour obtenir une dilution 1:20. Ne pas utiliser d'eau du robinet.
4.4.2) Lavage de la plaque :
(a) Pour un laveur de plaques avec fonction d'aspiration du trop-plein : 6 cycles avec au moins 0,5 ml de tampon de lavage par puits par cycle.
Ou
(b) Pour un laveur de plaques sans fonction d'aspiration du trop-plein : 8 cycles avec au moins 0,35 ml de tampon de lavage par puits par cycle.
4.4.3) Sécher la plaque en la retournant et en la tapotant fermement sur du papier absorbant. Une trop grande quantité de tampon de lavage résiduel entraînera des résultats erronés.
AVERTISSEMENT
Un lavage insuffisant entraînera des résultats erronés.

4.5) Procédure du test

4.5.1) Placer tous les réactifs et échantillons à température ambiante (+20 à +30 °C) avant l'essai. Régler le bain-marie ou l'incubateur à 37±1 °C.
4.5.2) Préparation **du conjugué dilué**
1. Utiliser uniquement un récipient propre pour éviter une contamination.
2. Préparer un conjugué dilué en réalisant une dilution 1:20 du conjugué HCV Ag•HRPO concentré avec le diluant du conjugué, ou selon le tableau de préparation du conjugué ci-dessous. Remuer doucement pour bien mélanger et éviter la mousse.
3. La solution de conjugué dilué en excès doit être jetée après utilisation.

Tableau de préparation du conjugué :

Nombre de puits utilisés	Volume nécessaire de diluant du conjugué (ml)	Volume nécessaire de conjugué HCV Ag• HRPO conc. (µl)
8	1	50
16	2	100
24	3	150
32	4	200
40	5	250
48	6	300
56	7	350
64	8	400
72 - 80	9	450
81 - 96	10	500

4.5.3) Laisser un puits pour le blanc.
Ne pas ajouter d'échantillon ou de diluant de l'échantillon au puits pour le blanc.
4.5.4) Préparer le nombre nécessaire de puits, y compris 1 puits pour le blanc, 3 puits pour le contrôle négatif, 2 puits pour le contrôle positif et 1 puits pour chaque échantillon.

4.5.5) Ajout de l'échantillon :

4.5.5.1) Ajouter 100 µl de contrôle positif, contrôle négatif et échantillon à chaque puits approprié de la plaque d'antigènes HCV.

4.5.5.2) Bien mélanger en tapotant la plaque.

REMARQUE : Utiliser un nouvel embout de pipette après chaque prélèvement pour éviter la contamination croisée.

4.5.6) Sceller la plaque avec une bande adhésive.

4.5.7) Incuber la plaque dans un bain-marie ou un incubateur à circulation d'air à 37 ± 1 °C pendant 60 minutes.

REMARQUE : Ne pas empiler les plaques.

4.5.8) À la fin de la période d'incubation, retirer soigneusement et jeter la bande adhésive.

4.5.9) Laver la plaque selon le paragraphe 4.4) Procédure de lavage de la plaque.

4.5.10) Ajouter 100 µl de conjugué dilué à chaque puits sauf au blanc.

4.5.11) Sceller la plaque avec une bande adhésive.

4.5.12) Incuber la plaque dans un bain-marie ou un incubateur à circulation à 37 ± 1 °C pendant 30 minutes.

4.5.13) Répéter les étapes 4.5.8) et 4.5.9).

4.5.14) Sélectionner l'une des deux méthodes suivantes pour la coloration :

A. Mélanger immédiatement avant utilisation des volumes identiques de chromogéne TMB concentré et de tampon du substrat dans un récipient propre. Ajouter 100 µl de la solution de mélange à chaque puits, y compris au blanc.

B. Ajouter tout d'abord 50 µl de chromogéne TMB concentré, puis ajouter 50 µl de tampon du substrat à chaque puits, y compris au blanc. Bien mélanger avec précaution.

REMARQUE : Le chromogéne TMB concentré doit être incolore à bleu clair ; sinon, il faut le jeter. Le mélange de chromogéne TMB concentré et de tampon du substrat doit être utilisé dans les 30 minutes après le mélange. Le mélange doit être tenu à l'écart de toute lumière intense.

4.5.15) Sceller la plaque à l'aide d'une bande adhésive et incuber à 37 ± 1 °C pendant 15 minutes.

4.5.16) Stopper la réaction en ajoutant 100 µl de solution d'arrêt à chaque puits, y compris au blanc.

4.5.17) Déterminer l'absorbance des contrôles et des échantillons dans les 15 minutes, mesurée à 450 nm avec une longueur d'onde de référence sélectionnée entre 620 et 690 nm[*4].

Utiliser le puits blanc pour définir le zéro du spectrophotomètre.

REMARQUE : La couleur du blanc doit être incolore à jaune clair ; sinon, les résultats du test sont invalides. Blanc du substrat : la valeur d'absorbance doit être inférieure à une DO de 0,100.

4.6) Calcul des données testées

4.6.1) Calcul du NCx (absorbance moyenne du contrôle négatif).

Exemple :

Nº d'échantillon	Absorbance
1	0,045
2	0,060
3	0,051

NCx = (0,045+0,060+0,051) /3 = 0,052

Le NCx doit être ≤ 0,200, sinon le test n'est pas valide.

4.6.2) Calcul du PCx (absorbance moyenne du contrôle positif).

Exemple :

Nº d'échantillon	Absorbance
1	1,510
2	1,826

PCx = (1,510 + 1,826) /2 = 1,668

Le PCx doit être ≥ 0,600, sinon le test n'est pas valide.

4.6.3) Calcul de la **valeur P - N**

P-N = PCx **-** NCx

Exemple :

P - N = 1,668 – 0,051 = 1,617

La valeur P – N doit être ≥ 0,400, sinon le test n'est pas valide.

4.6.4) Calcul de la **valeur du seuil de positivité**

Valeur du seuil de positivité = NCx + 0,100

Exemple :

Valeur du seuil de positivité = 0,053+0,100 = 0,153

4.6.5) Calculer l'indice du seuil de positivité des échantillons

Indice du seuil de positivité = Valeur DO de l'échantillon/Valeur du seuil de positivité

Exemple :

La valeur de l'échantillon est 0,596

Indice du seuil de positivité = 0,596/0,153 = 3,895

4.6.6) Zone grise : Indice du seuil de positivité = 1,000 ～ 1,500

4.7) Contrôle qualité du run de tests

4.7.1) **Le NCx doit être ≤ 0,200, sinon le test n'est pas valide.**

4.7.2) **Le PCx doit être ≥ 0,600, sinon le test n'est pas valide.**

4.7.3) **La valeur P – N doit être ≥ 0,400, sinon le test n'est pas valide.**
REMARQUE : Contrôle négatif: la valeur d'absorbance doit être inférieure ou égale à 0,200 après avoir soustrait le blanc.

4.8) Interprétation des résultats

4.8.1) Les échantillons avec **INDICE DU SEUIL DE POSITIVITÉ < 1,000** sont considérés comme **NON RÉACTIFS** par les critères de l'Anti-HCV Elisa V 4.0 de DIAsource.

4.8.2) Les échantillons avec un **INDICE DU SEUIL DE POSITIVITÉ ≥ 1,000** sont considérés comme initialement **RÉACTIFS**. Ils doivent être **TESTES A NOUVEAU** en doublon.
Si les deux **INDICES DU SEUIL DE POSITIVITÉ** du doublon sont **SUPÉRIEURS** à 1,500, l'échantillon est considéré comme **RÉACTIF** réitéré pour les anti-HCV par les critères de l'Anti-HCV Elisa V 4.0 de DIAsource ImmunoAssays SA.
Les échantillons réactifs réitérés de l'Anti-HCV Elisa V 4.0 doivent être encore testés par des tests supplémentaires plus spécifiques.

4.8.3) Les échantillons initialement réactifs, dont les **INDICES DU SEUIL DE POSITIVITÉ** du nouveau test en double sont **INFÉRIEURS** à **1,000**, seront considérés comme **NON RÉACTIFS** pour les anti-HCV.

4.8.4) Si l'un des deux **INDICES DU SEUIL DE POSITIVITÉ** du test en doublon est **SUPÉRIEUR** à **1,000**, mais **INFÉRIEUR** à **1,500**, l'échantillon peut être interprété comme **DISCUTABLE** et cette personne doit être surveillée par des échantillons de suivi ou des tests supplémentaires plus spécifiques doivent être effectués.

4.8.5) Si l'un des **INDICES DU SEUIL DE POSITIVITÉ** du doublon est **SUPÉRIEUR** à **1,500** et que l'autre est **INFÉRIEUR** à **1,000**, cela indique une **erreur** expérimentale inhabituelle. Le test doit être refait.

4.9) Résolution des problèmes

Si le résultat ne peut être reproduit, réaliser une procédure de contrôle préliminaire en vérifiant les possibilités ci-dessous :
4.9.1) Procédure de lavage de la plaque inappropriée.
4.9.2) Contamination avec un échantillon positif.
4.9.3) Volume incorrect d'échantillon, conjugué ou substrat.
4.9.4) Contamination du bord du puits avec un conjugué.
4.9.5) Échantillon inapproprié, par exemple sérum ou plasma hémolysé, échantillon contenant des sédiments et échantillon insuffisamment mélangé avant utilisation.
4.9.6) Durée ou température d'incubation incorrecte.
4.9.7) Tête et aiguilles d'aspiration/distribution du laveur obstruées ou partiellement obstruées.
4.9.8) Aspiration insuffisante.

4.10) Limites et interférences

4.10.1) Ce kit de réactifs doit être uniquement utilisé pour du sérum ou du plasma humain non mis en pool.
4.10.2) Ce kit de réactifs n'a pas été validé pour une utilisation avec des échantillons prélevés sur des cadavres.
4.10.3) Les échantillons présentant un très faible taux d'anti-HCV peuvent ne pas être continuellement positifs. Dans ce cas, il est recommandé de tester des échantillons de suivi.
4.10.4) Un résultat anti-HCV négatif n'exclut pas la possibilité d'une infection par HCV.
4.10.5) Des résultats faux positifs non réitérables peuvent se produire en raison d'une liaison non spécifique de l'échantillon et du conjugué sur la paroi des puits.
4.10.6) Substances pouvant provoquer des interférences : il n'existe aucune influence significative sur l'Anti-HCV Elisa V 4.0.

4.11) Conditions de stockage et stabilité

Kit/composants	Température de stockage	État	Stabilité
KIT Anti-HCV Elisa V 4.0	+2 à +8 °C	Original	18 mois
		Après ouverture	1 mois
Contrôle Anti-HCV positif	+2 à +8 °C	Original	18 mois
		Après ouverture	1 mois
Contrôle Hépatite C négatif	+2 à +8 °C	Original	18 mois
		Après ouverture	1 mois
Plaque d'antigènes HCV	+2 à +8 °C	Original	18 mois
		Après ouverture	1 mois
Solution du conjugué HCV antigen•HRPO concentré	+2 à +8 °C	Original	18 mois
		Après ouverture	1 mois

Solution du conjugué antigène HCV•HRPO conc.	Temp. ambiante	Diluée	6 heures
	+2 à +8 °C	Diluée	2 jours
Diluant du conjugué	+2 à +8 °C	Original	18 mois
		Après ouverture	1 mois
Solution de lavage D concentrée (20X)	Temp. ambiante	Original	24 mois
		Après ouverture	1 mois
Solution de lavage diluée 20X	Temp. ambiante	Diluée	2 jours
	+2 à +8 °C	Diluée	1 semaine
Chromogéne TMB concentré	+2 à +8 °C	Original	24 mois
		Après ouverture	1 mois
Tampon du substrat	+2 à +8 °C	Original	24 mois
		Après ouverture	1 mois
Mélange de solution du substrat TMB	Temp. ambiante	Mélange	6 heures
Solution d'arrêt	Temp. ambiante	Original	24 mois
		Après ouverture	1 mois

4.12) Performance

4.12.1) Spécificité analytique

Substances pouvant provoquer des interférences : il n'existe aucune influence significative sur l'Anti-HCV Elisa V 4.0.

Substances pouvant provoquer des interférences	n de tests	n de réactifs	n de non réactifs
Sérum avec des substances provoquant des interférences en proportions fixes (Triglycérides, hémoglobine, bilirubine, IgG et IgM monoclonales et facteur rhumatoïde)	50 tests	0	50
Panels d'inhibition (EDTA, hémoglobine, triglycéride, bilirubine et héparine)	14 échantillons négatifs 14 échantillons positifs	0 14	14 0
Panels d'anticoagulants (sérum, plasma EDTA, plasma hépariné et plasma citraté)	25 échantillons négatifs 25 échantillons positifs	0 25	25 0
Total	128 échantillons testés	39	89

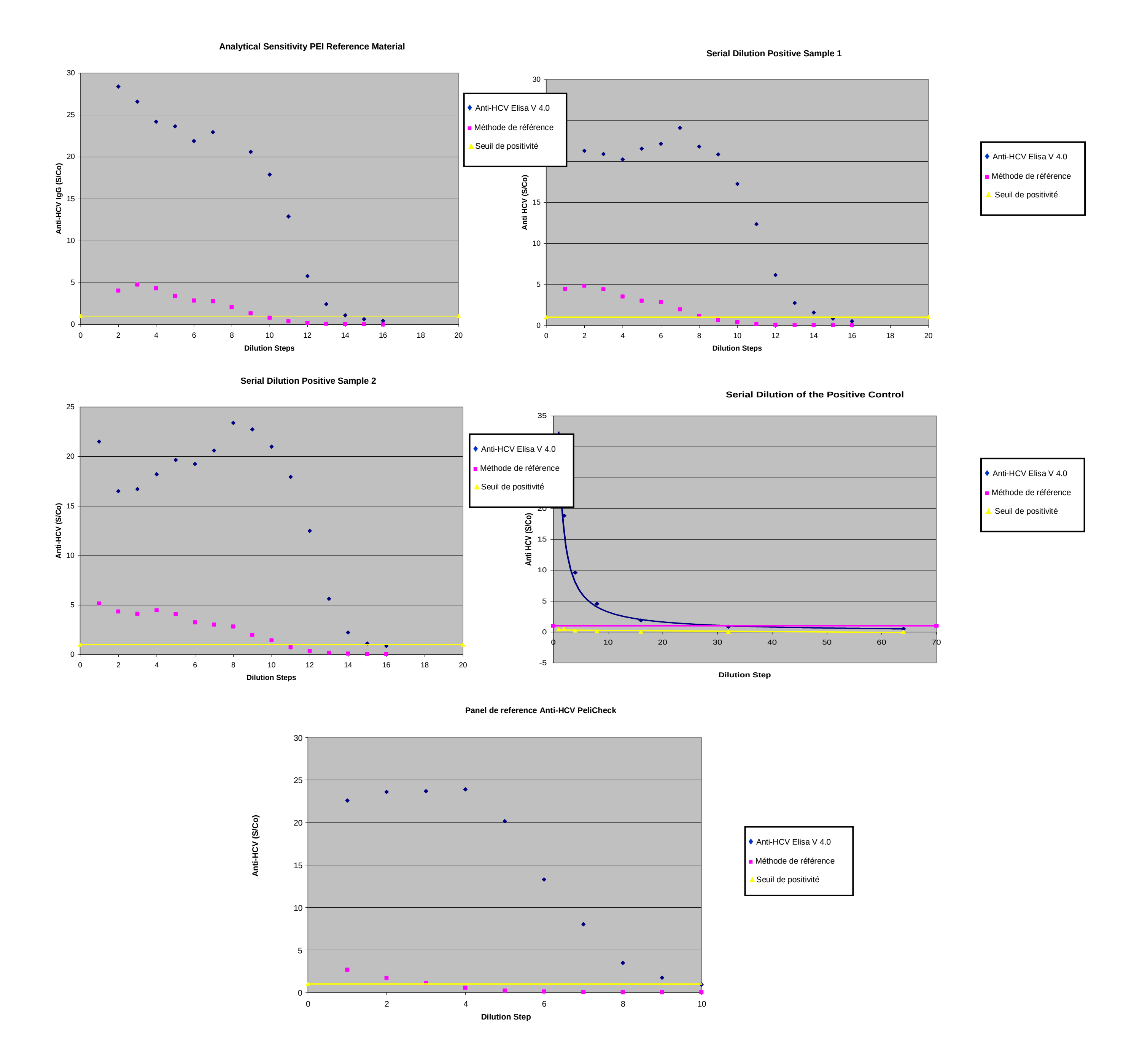
4.12.2) Spécificité clinique

Spécificité clinique = 5356/5369 = 99,8 %

Substances pouvant provoquer des interférences	n de tests	n de réactifs	n de non réactifs	Spécificité
Donneurs de sang	5 169	12	5 157	99,77 %
Échantillons cliniques / hospitaliers	200	1	199	99,5 %
Échantillons sériques/plasmatiques avec réaction croisée potentielle	100	0	100	100 %
Total	5 369	13	5 356	99,8 %

4.12.3) Sensibilité analytique

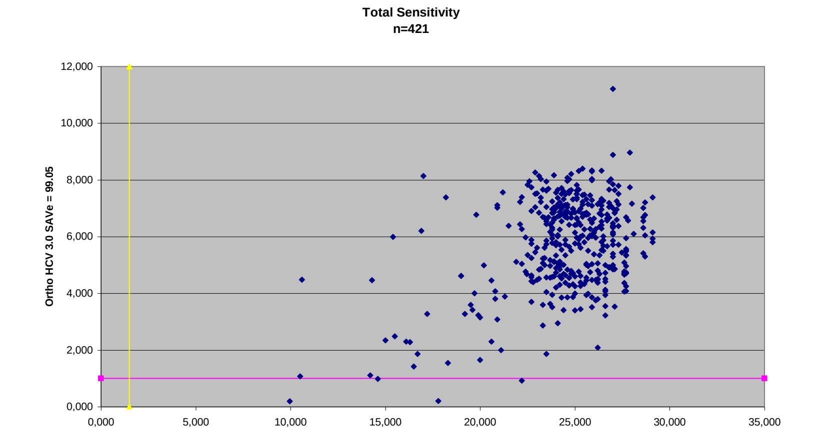
La sensibilité analytique de l'essai Anti-HCV Elisa V 4.0 est supérieure au test de référence.



4.12.4) Sensibilité clinique

1. Personnes infectées par le HCV :

La sensibilité diagnostique de l'Anti-HCV Elisa V 4.0 de DIAsource ImmunoAssays SA était de 100 %.
421 des 421 échantillons positifs incluant 20 échantillons par génotype pour les génotypes 1a – 4a et 5 échantillons pour les génotypes 6 ont été testés et confirmés réactifs pour les anticorps dirigés contre le HCV.



2. Panels commerciaux de séroconversion :

L'essai Anti-HCV Elisa V 4.0 a montré une sensibilité accrue de la séroconversion comparé à la méthode de référence choisie : l'anti-HCV ELISA marqué CE.

Le nombre total d'échantillons testés parmi les 22 panels de séroconversion s'élevait à 198. Parmi eux, soixante-trois (63) échantillons ont été testés réactifs avec l'essai Anti-HCV Elisa V 4.0, tandis que seuls 44 de ces échantillons ont été testés réactifs avec la méthode de référence.

4.12.5) Précision

1. Reproductibilité intra-essai

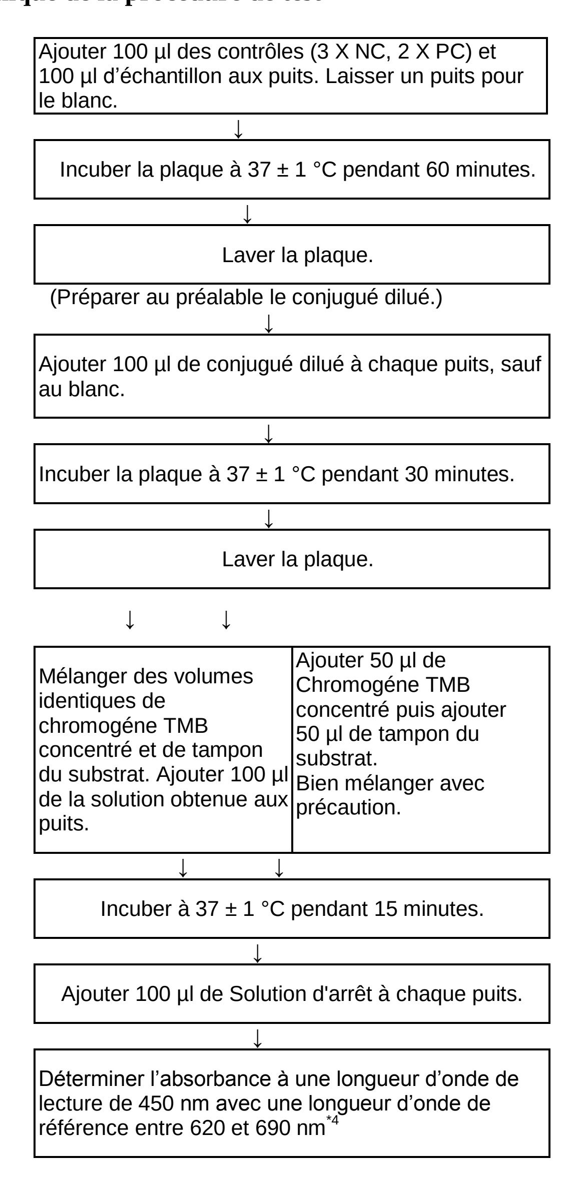
INDICE DU SEUIL	Sérum positif 1		Sérum positif 2		Contrôle positif	
	Moyenne	CV (%)	Moyenne	CV (%)	Moyenne	CV (%)
Jour 1	4,49	7,22	9,01	5,94	21,79	4,91
Jour 2	4,16	13,06	8,54	9,41	21,44	4,23
Jour 3	5,07	5,24	10,64	9,27	21,70	3,08
Moyenne	**4,57**	**8,51**	**9,40**	**8,21**	**21,64**	**4,07**

2. Imprécision totale

Lot C68332PT		CUTOFF INDEX			
Run-No	Run Date	NC	PS1	PS2	PC
1	15/7/08	0.31	5.03	10.70	22.50
2	18/7/08	0.30	4.52	7.83	23.56
3	18/7/08	0.30	4.83	9.58	21.16
4	21/7/08	0.29	5.72	10.40	21.38
5	22/7/08	0.33	4.91	8.82	20.72
6	22/7/08	0.33	4.53	10.10	17.25
7	23/7/08	0.27	3.79	6.39	16.86
8	23/7/08	0.34	4.21	8.08	18.42
9	24/7/08	0.29	5.03	7.96	20.59
10	24/7/08	0.35	4.59	8.48	20.59
MEAN		**0.31**	**4.73**	**8.83**	**20.30**
SD		**0.03**	**0.52**	**1.36**	**2.17**
CV		**8.34**	**11.05**	**15.34**	**10.69**

Lot C68333PT		CUTOFF INDEX			
Run-No	Run Date	NC	PS1	PS2	PC
1	19/8/08	0,33	5,63	10,05	20,08
2	19/8/08	0,25	4,96	10,50	18,10
3	20/8/08	0,29	5,62	10,50	21,48
4	21/8/08	0,34	4,05	9,49	20,05
5	21/8/08	0,33	5,31	10,20	19,36
6	22/8/08	0,31	5,34	8,97	19,08
7	22/8/08	0,31	5,39	9,16	19,72
8	25/8/08	0,25	4,31	8,64	18,79
9	25/8/08	0,30	5,74	10,60	21,10
10	26/8/08	0,27	6,03	11,30	20,83
MEAN		**0,30**	**5,15**	**9,94**	**19,86**
SD		**0,03**	**0,63**	**0,85**	**1,07**
CV		**10,82**	**12,22**	**8,51**	**5,39**

4.13) Représentation graphique de la procédure de test



5) BIBLIOGRAPHIE

*1 Abe K, Inchauspe C, Shikate T, and Prince AM. (1992) Three different patterns of hepatitis C virus infection on chimpanzees. Hepatology, 15:690.
*2 Claets H, Volckaerts A, De Beenhouwer H, Vermylen C. (1992) Association of hepatitis C virus carrier state with the occurrence of hepatitis C virus core antibodies. J. Med. Virol. 36:259-264.
*3 Beach MJ, et al. (1992) Temporal relationship of hepatitis C virus RNA and antibody responses following experimental infection of chimpanzee. J Med. Virol. 36:226-237.
*4 La longueur d'onde de référence du spectromètre peut se situer entre 620 et 690 nm. Cependant, l'utilisateur doit, avant utilisation, valider le spectromètre par rapport au kit utilisé.
*5 Incomplete inactivation of hepatitis B virus after heat treatment at 60°C for 10 hours, J. Infect. Dis. 138:242-244.
*6 The supplier is: VQC-AcroMetrix: Jan Steenstraat 1,NL-1816 CT Alkmaar, The Netherlands. Type 7 is available in lyophilised or liquid format. The catalogue numbers are S2233 (lyophilised format) and S2058 (liquid format).
*7 National Inst. For Biological Standards & Control (NIBSC), Blabche Lane South Mimms Potters Bar Herts EN6 3QG, UK; Anti-HCV British Working Standard, Product Code: 02/238-004.

Date de révision : 2011-07-11



Anti-HCV Elisa V 4.0.

es

Para la detección cualitativa in-vitro del Anticuerpo contra el virus de la Hepatitis C (anti-VHC) en suero o plasma humano

KAPG4NAE3

PARA USO DE DIAGNÓSTICO IN VITRO

DIAsource ImmunoAssays SA - Rue du Bosquet 2, B-1348 Louvain-la-Neuve, Belgium Tel: +32 10 84 99 11 - Fax : +32 10 84 99 90

1) USO PREVISTO

El kit de diagnóstico **Anti-HCV Elisa V 4.0** es un inmunoensayo enzimático de cuarta generación para la detección cualitativa in vitro del anticuerpo contra el virus de la Hepatitis C (anti-VHC) en suero o plasma humano.

2) TEORÍA DEL DISEÑO/BREVE DESCRIPCIÓN DEL PRODUCTO

Elisa V 4.0 Anti-VHC adopta el “principio del sándwich directo” como la base del ensayo para detectar anticuerpos contra el virus de la Hepatitis C (anti-VHC). Es un kit de inmunoensayo enzimático de cuarta generación que usa antígenos recombinantes del VHC (antígenos Core, NS3 y NS5) para la detección del virus de la Hepatitis C (anti-VHC) en suero o plasma humano.[*1-3] Estos antígenos, que reaccionan con los anticuerpos predominantes contra el VHC, constituyen la fase solida antigénica absorbente. Cuando el suero o plasma humano se agrega a los pocillos, si anti- VHC está presente en la muestra, los antígenos del VHC formarán complejos con anti-VHC. Se lavan los pocillos para eliminar el material que no se ha unido. Se agrega el conjugado diluido HVC Ag•HRPO a los pocillos lo que resulta en la formación de un complejo (VHC) • (Anti-VHC) • (VHC Ag•HRPO). Después de eliminar por lavado el complejo que no se ha unido, se agrega una solución de sustrato TMB para desarrollar color. La intensidad del color es proporcional a la cantidad de anticuerpos presentes en la muestra. Los procesos reactivos están resumidos como sigue:

A. Muestra (que contiene anti-VHC):

1. Placa (VHC Ag) + muestra (que contiene Anti-VHC) -→ placa (VHC Ag) • Anti- VHC
2. Lave para eliminar el material que no se ha unido.
3. Placa (VHC Ag) Anti- VHC + VHC Ag•HRPO → placa (VHC Ag)•Anti- VHC • VHC Ag•HRPO complejo
4. Lave para eliminar el material que no se ha unido.
5. Placa (VHC Ag) •Anti- VHC • VHC Ag•HRPO complejo + solución de sustrato TMB → de color azul claro a azul
6. De color azul claro a azul + solución de parada →de color amarillo pálido a amarillo, medido a 450nm con una longitud de onda seleccionada entre 620 y 690nm[*4]

B. Muestra (sin anti-VHC):

1. Placa (VHC Ag) + muestra (sin Anti-VHC) → placa (VHC Ag)
2. Lave para eliminar el material que no se ha unido.
3. Placa (VHC Ag) + VHC Ag•HRPO → placa (VHC Ag)------ no se formará un complejo
4. Lave para eliminar el material que no se ha unido.
4. Placa (VHC Ag) + solución de sustrato TMB (incolora) → incolora
5. Incolora + solución de parada → incolora, medida a 450nm con una longitud de onda de referencia seleccionada de 620 a 690nm[*4]

3) DESCRIPCIÓN DE MATERIALES SUMINISTRADOS & SISTEMA DE CÓDIGOS DE PRODUCTOS

● Item 1 - 7 **en la siguiente tabla de reactivos deben permanecer refrigerados entre + 2 y +8°C. La Solución de Lavado (20X) y la solución de parada pueden almacenarse entre +2 y +30°C.**

ITEMS	Componentes	Descripción	Cant. para 96 ensayos
(1)	VHC Ag Placa	Una microplaca recubiertos con antigenos VHC.	1 placa

	Used symbols
	Consult instructions for use
	Storage temperature
	Use by
LOT	Batch code
REF	Catalogue number
CONTROL	Control
IVD	In vitro diagnostic medical device
	Manufacturer
Σ	Contains sufficient for <n> tests
WASH SOLN CONC	Wash solution concentrated
CAL 0	Zero calibrator
CAL N	Calibrator #
CONTROL N	Control #
Ag 125I	Tracer
Ab 125I	Tracer
Ag 125I CONC	Tracer concentrated
Ab 125I CONC	Tracer concentrated
	Tubes
INC BUF	Incubation buffer
ACETONITRILE	Acetonitrile
SERUM	Serum
DIL SPE	Specimen diluent
DIL BUF	Dilution buffer
ANTISERUM	Antiserum
IMMUNOADSORBENT	Immunoadsorbent
DIL CAL	Calibrator diluent
REC SOLN	Reconstitution solution
PEG	Polyethylene glycol
EXTR SOLN	Extraction solution
ELU SOLN	Elution solution
GEL	Bond Elut Silica cartridges
PRE SOLN	Pre-treatment solution
NEUTR SOLN	Neutralization solution
TRACEUR BUF	Tracer buffer
	Microtiterplate
Ab HRP	HRP Conjugate
Ag HRP	HRP Conjugate
Ab HRP CONC	HRP Conjugate concentrate
Ag HRP CONC	HRP Conjugate concentrate
CONJ BUF	Conjugate buffer
CHROM TMB CONC	Chromogenic TMB concentrate
CHROM TMB	Chromogenic TMB solution
SUB BUF	Substrate buffer
STOP SOLN	Stop solution
INC SER	Incubation serum
BUF	Buffer
Ab AP	AP Conjugate
SUB PNPP	Substrate PNPP
BIOT CONJ CONC	Biotin conjugate concentrate
PREC AGENT	Precipitating Agent
AVID HRP CONC	Avidine HRP concentrate
ASS BUF	Assay buffer
Ab BIOT	Biotin conjugate
Ab	Specific Antibody
SAV HRP CONC	Streptavidin HRP concentrate
NSB	Non-specific binding
2nd Ab	2nd Antibody
ACID BUF	Acidification Buffer
DIST	Distributor
TRAY	Incubation trays
PMSF	PMSF solution
	Protect from light
STRIP	Dot Strip
SUB	Substrate
EXTR SOLN CONC	Extraction Buffer Concentrate
CART	Cartridge
SAV HRP	Streptavidin HRP
PIPETTE	Pipette
WASH SOLN	Wash buffer

	Symboles utilisés
	Consulter les instructions d'utilisation
	Température de conservation
	Utiliser jusque
LOT	Numéro de lot
REF	Référence de catalogue
CONTROL	Contrôle
I V D	Dispositif médical de diagnostic in vitro
	Fabricant
	Contenu suffisant pour <n> tests
WASH SOLN CONC	Solution de lavage concentrée
CAL 0	Calibrateur zéro
CAL N	Calibrateur #
CONTROL N	Contrôle #
Ag 125I	Traceur
Ab 125I	Traceur
Ag 125I CONC	Traceur concentré
Ab 125I CONC	Traceur concentré
	Tubes
INC BUF	Tampon d'incubation
ACETONITRILE	Acétonitrile
SERUM	Sérum
DIL SPE	Diluant du spécimen
DIL BUF	Tampon de dilution
ANTISERUM	Antisérum
IMMUNOADSORBENT	Immunoadsorbant
DIL CAL	Diluant de calibrateur
REC SOLN	Solution de reconstitution
PEG	Glycol Polyéthylène
EXTR SOLN	Solution d'extraction
ELU SOLN	Solution d'elution
GEL	Cartouches Bond Elut Silica
PRE SOLN	Solution de pré-traitement
NEUTR SOLN	Solution de neutralisation
TRACEUR BUF	Tampon traceur
	Microplaque de titration
Ab HRP	HRP Conjugué
Ag HRP	HRP Conjugué
Ab HRP CONC	HRP Conjugué concentré
Ag HRP CONC	HRP Conjugué concentré
CONJ BUF	Tampon conjugué
CHROM TMB CONC	Chromogène TMB concentré
CHROM TMB	Solution chromogène TMB
SUB BUF	Tampon substrat
STOP SOLN	Solution d'arrêt
INC SER	Sérum d'incubation
BUF	Tampon
Ab AP	AP Conjugué
SUB PNPP	Tampon PNPP
BIOT CONJ CONC	Biotine conjugué concentré
PREC AGENT	Agent de précipitation
AVID HRP CONC	Avidine HRP concentré
ASS BUF	Tampon de test
Ab BIOT	Biotine conjugué
Ab	Anticorps spécifique
SAV HRP CONC	Concentré streptavidine HRP
NSB	Liant non spécifique
2nd Ab	Second anticorps
ACID BUF	Tampon d'acidification
DIST	Distributeur
TRAY	Plaque d'incubation
PMSF	Solution PMSF
	Conserver à l'abri de la lumière
STRIP	Bandelette de dots
SUB	Substrat
EXTR SOLN CONC	Tampon d'extraction concentré
CART	Cartouche
SAV HRP	Streptavidine-peroxydase de raifort
PIPETTE	Pipette
WASH SOLN	Tampon de lavage

	Símbolos utilisados
	Consultar las instrucciones de uso
	Limitación de temperatura
	Fecha de caducidad
LOT	Codigo de lote
REF	Número de catálogo
CONTROL	Control
I V D	Producto sanitario para diagnóstico in vitro
	Fabricante
	Contenido suficiente para <n> ensayos
WASH SOLN CONC	Solución de lavado concentrada
CAL 0	Calibrador cero
CAL N	Calibrador #
CONTROL N	Control #
Ag 125I	Trazador
Ab 125I	Trazador
Ag 125I CONC	Trazador concentrada
Ab 125I CONC	Trazador concentrada
	Tubos
INC BUF	Tampón de incubación
ACETONITRILE	Acetonitrilo
SERUM	Suero
DIL SPE	Diluyente de Muestra
DIL BUF	Tampón de dilución
ANTISERUM	Antisuero
IMMUNOADSORBENT	Inmunoadsorbente
DIL CAL	Diluyente de calibrador
REC SOLN	Solución de Reconstitución
PEG	Glicol Polietileno
EXTR SOLN	Solución de extracción
ELU SOLN	Solución de elución
GEL	Cartuchos Bond Elut Silica
PRE SOLN	Solución de Pre-tratamiento
NEUTR SOLN	Solución de Neutralización
TRACEUR BUF	Tampón de trazador
	Placa de microvaloración
Ab HRP	HRP Conjugado
Ag HRP	HRP Conjugado
Ab HRP CONC	HRP Conjugado concentrada
Ag HRP CONC	HRP Conjugado concentrada
CONJ BUF	Tampón de Conjugado
CHROM TMB CONC	Cromógena TMB concentrada
CHROM TMB	Solución Cromógena TMB
SUB BUF	Tampón de sustrato
STOP SOLN	Solución de Parada
INC SER	Suero de Incubación
BUF	Tampón
Ab AP	AP Conjugado
SUB PNPP	Sustrato PNPP
BIOT CONJ CONC	Concentrado de conjugado de biotina
PREC AGENT	Agente de precipitación
AVID HRP CONC	Concentrado avidina-HRP
ASS BUF	Tampón de ensayo
Ab BIOT	Conjugado de biotina
Ab	Anticuerpo específico
SAV HRP CONC	Estreptavidina-HRP Concentrado
NSB	Unión no específica
2nd Ab	Segundo anticuerpo
ACID BUF	Tampón de Acidificación
DIST	Distribuidor
TRAY	Bandejas de incubación
PMSF	Solución de PMSF
	Proteger de la luz
STRIP	Tries Dot
SUB	Sustrato
EXTR SOLN CONC	Concentrado de tampón de extracción
CART	Cartucho
SAV HRP	Estreptavidina HRP
PIPETTE	Pipeta
WASH SOLN	Tampón de lavado